Al Cav. Dott. Paolo C. Buridani
in segno d'ossequio e d'affetto —
R. Balladore

Dott. Renzo Balladore-Pallieri

AZIONE DEL PLASMA MUSCOLARE

DI ANIMALI SANI ED IMMUNIZZATI

SUL BACILLO DI KOCH

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

SULLA LOTTA E LA IMMUNIZZAZIONE DELL'ORGANISMO

CONTRO IL BACILLO DELLA TUBERCOLOSI

Dott. Renzo Balladore-Pallieri

AZIONE DEL PLASMA MUSCOLARE

DI ANIMALI SANI ED IMMUNIZZATI

SUL BACILLO DI KOCH

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

SULLA LOTTA E LA IMMUNIZZAZIONE DELL' ORGANISMO

CONTRO IL BACILLO DELLA TUBERCOLOSI

AI MIEI GENITORI

PRESSO ALLA META SORRISA

CON AFFETTO E RICONOSCENZA

DI LORO ASSIDUE AMOROSISSIME CURE

AL PROFESSORE

EDOARDO MARAGLIANO

SENATORE DEL REGNO

CON FERVIDA DEVOZIONE DI DISCEPOLO

IL TENUE LAVORO

FRUTTO DELLE SUE MIRABILI LEZIONI

RISPETTOSAMENTE CONSACRO

INTRODUZIONE

Nella conferenza tenutasi, lo scorso marzo, all'*Henry Phipps Institute* di Philadelphia (*) sulla *terapia specifica della tubercolosi e la sua vaccinazione* il mio illustre Maestro, il Prof. Maragliano, esponeva i risultati originali ed importantissimi ottenutisi nella sua Clinica medica e nel suo Istituto per lo studio e la cura della tubercolosi, ed accennando al fatto che il siero di sangue, il sangue, ed il latte stesso di animali artificialmente immunizzati contro la tubercolosi forniscono all' organismo umano elementi di resistenza contro il terribile morbo, elevava acutamente il dubbio che la carne di animali così immunizzati potesse avere anch' essa valori antitossici, battericidi, ed agglutinanti sul bacillo di Koch.

Maragliano entrava così in un campo fertile alla Scienza, nuovo per le possibili applicazioni, e nel quale

(*) Il *The Henry Phipps* di Philadelphia è un Istituto universitario fondato dal filantropo americano Henry Phipps per lo studio, la profilassi e la cura della tubercolosi. Questo Istituto avendo organizzato una serie di conferenze mensili chiamò a sè, per trattare su tale importantissimo argomento, i più reputati scienziati americani ed europei, quali i Proff. *Trudeau* di Philadelphia, il *Panwitz* di Berlino, l' *Osler* di Baltimora, il *Calmette* di Lione, il *Maragliano* di Genova, il *Biggs* di New-Jork.

la genialità del Maestro e l' opera dei suoi discepoli apportarono già da molti anni le prime e fruttuose sementi.

E nella sua conferenza Egli, rivolgendosi al Genio dell' iniziativa americana, conchiudeva:

« E poichè il latte, il siero di sangue, il sangue e *probabilmente* anche la carne degli animali immunizzati, possono fornire all' organismo umano elementi di resistenza contro la tubercolosi, perchè non potranno questi essere utilizzati nella alimentazione e fornire così, coi materiali normali della nutrizione, i materiali immunizzatori?

Perchè a vece del latte comune non si potrà fornire latte di vacca immunizzata? Perchè a vece delle carni comuni non si potranno fornire carni di animali immunizzati? Per questo punto le ricerche scientifiche sono già in caso di poter essere utilizzate a beneficio dell' umanità.

La lotta contro la tubercolosi, bisogna ricordarlo, non può essere efficace che riuscendo ad agguerrire l' organismo contro di essa. Tutti i mezzi escogitati per distruggere il bacillo non approderanno a nulla di decisivo come non hanno approdato i cordoni sanitari contro altre infezioni. Le vittime della tubercolosi diminuiranno quanto più l' organismo umano sarà in grado di resistere ad essa. In questa formola sta tutto il segreto della vittoria.

Qui nel vostro grande paese, in cui sono così potenti le iniziative, qui dovrebbe nascere un grande movimento consistente nell'utilizzare praticamente, per

gli usi della vita normale, tutte le conquiste scientifiche che già possediamo per agguerrire l' organismo contro la tubercolosi.

E se la mia conferenza avesse questo risultato, di svegliare in America una grande iniziativa in questo senso, certo essa avrebbe raggiunto il più alto scopo possibile.

E se questa iniziativa partisse dalla vostra nobile Istituzione, essa si avvicinerebbe molto alla meta elevata cui essa aspira: la meta di redimere l' umanità dalla tubercolosi. Lasciate che questa sia la mia fede e la mia speranza. »

Sono queste nobilissime parole e tali da farci meditare assai sulla nostra fibra geniale ma inerte di popolo latino!

Se volessimo risalire ai tempi passati, ed esporre una cronistoria, per quanto breve, della lotta contro il bacillo della tubercolosi, dal giorno in cui *Roberto Koch* svelava la presenza del *gran nemico* nel campo del microscopio e *Baccelli,* gloria nostra, profetizzava subito dopo che il bacillo di Koch non poteva essere *tutta la tubercolosi ma solo il suo esponente batterico,* sino al giorno in cui *Maragliano* rilevava pel primo la parte importantissima che si doveva attribuire alle associazioni microbiche attive nella genesi di quella malattia, ben distinta dalla tubercolosi, che è la *tisi,* ed iniziava i suoi mirabili studi sull' azione patogena dei veleni contenuti o secreti dal bacillo, noi, seguendo passo passo le vittorie ottenute, contese palmo a palmo con serena e tenace attività, pagate talora con sacri-

ficio nobilissimo della propria vita, dovremmo scrivere una lunga e gloriosa pagina della storia della Medicina e citare una ammirabile schiera di sperimentatori italiani! Ma a noi adesso, interessa, più che la storia, la conoscenza chiara e precisa dei principali fenomeni dell' immunizzazione anti-tubercolare, affinchè sia ben compresa la ragione del nostro studio e degli esperimenti affidatici.

Per quanto all' inizio della nostra nuova vita professionale, per quanto soggiogati dalle illusioni e dalle speranze del nostro ardore giovanile, abbiamo potuto convincerci che lo scetticismo con il quale frequentemente noi italiani accogliamo le nuove ricerche sono frutto di una incompleta conoscenza delle ricerche stesse.

In tema di tubercolosi appunto perchè, nella pluralità dei casi, scarse sono le conoscenze esatte sul processo tubercolare, le serene discussioni ed i sani criteri che dovrebbero essere fertili di ammaestramenti, degenerano talora in un olimpico disprezzo; per cui verità, indiscusse più tardi, e scoperte, invidiateci e carpiteci, dirò anche, dallo straniero, hanno trovato e trovano sin dal loro inizio un' opposizione sistematica ed ingiusta!

Nè a torto il nostro Maestro nel Congresso contro la tubercolosi, tenutosi a Napoli nel 1900, esclamava *che per quanto studiata, la tubercolosi è fino ad ora una fra le meno conosciute infermità umane*, ed incitava i suoi illustri colleghi a cooperare ad una nobile e necessaria opera, quella cioè diretta a distruggere le

erronee convinzioni radicatesi nella mente dei medici ed a famigliarizzarli con le nuove conquiste fatte nel campo della tubercolosi.

Noi intanto, presentando all' esame di Laurea queste note desunte dai protocolli d' esperienze dell' Istituto per lo studio e la cura della tubercolosi, siamo fieri di aver potuto portare il nostro modesto contributo all' opera del Maestro e dei suoi collaboratori, intesa da ben venticinque anni ad immunizzare artificialmente ed attivamente l' organismo umano contro la tubercolosi e ci sia permesso di porgere al Prof. Maragliano i sensi della nostra più viva gratitudine e devozione nel permetterci di compiere nel suo Istituto le ricerche sul potere antitossico ed antibatterico del *plasma muscolare di animali sani ed immunizzati* e i nostri vivi ringraziamenti al Dr. Marzagalli, capo del laboratorio sierotepatico, che ci fu dotta e carissima guida.

Genova, Giugno del 1904.

Stabilitosi il principio che l'organismo animale possegga, di sua natura, una resistenza, più o meno spiccata secondo le varie specie, contro le infezioni microbiche, era giusto e razionale che l'uomo, nella sua lotta contro i micro-organismi patogeni, cercasse di sapere se era possibile di aumentare artificialmente negli organismi animali questa immunità naturale.

E poichè le ricerche fattesi in tale campo dimostrarono luminosamente che gli organismi sottoposti a speciali trattamenti immunizzanti aumentano i loro poteri antibatterici, antitossici, litici, agglutinanti, etc., il problema che occupa e stanca oggidì i nostri scienziati è quello di rendere completamente refrattario, con un metodo sicuro ed innocuo, l'organismo animale alla deleteria azione dei micro-organismi patogeni specifici.

Dato il carattere essenzialmente sperimentale e speciale di questa nostra breve nota scientifica sorvoleremo sulle molteplici teorie emesse, più o meno genialmente, onde spiegare il meccanismo di formazione delle immunità naturali ed acquisite, nè entreremo a

discutere con la *scuola umorale* del *Flügge* e del *Pfeiffer* o con quella *fagocitaria* del *Metchnikoff*, del *Buchner*, del *Cantacuzeme*, del *Salimbeni* e del *Levaditi* per assicurarci se l'ufficio di deposito dei poteri immunizzanti risieda nel *plasma liberamente circolante* anzichè nei *fagociti* del sangue.

Scopertasi la specificità del bacillo di Koch si bandì allora, come era d' altra parte necessario e doveroso, dalla terapia tubercolare l'empirismo e l'azione inutile dei farmaci chimici e, forte delle nuove cognizioni acquistate, lo scienziato aggredì il bacillo tubercolare con un'arma ben più terribile e razionale: quella della *immunità artificiale specifica* che si ottiene, stranissimo fatto questo, con i veleni che ci fornisce lo stesso bacillo!

E le ricerche sul metodo di ottenere questa immunità, rapidamente e sicuramente, durarono sette anni circa, da quando cioè *Richet* ed *Héricourt* iniziarono le loro prime esperienze seguite da quelle di *Semmola*, *Mussini*, *Volpe*, *Bertin*, *Commout* e *Dor*, *Babes*, *Boinet*, *Broca*, *Behring*, *Maffucci* e *Di Vestea*, *Silvestrini* e *Baduel* e da altri ancora, sino al giorno in cui, dopo l'insuccesso catastrofico della *linfa di Koch*, *Maragliano* stabiliva nel 1895 quale fosse il migliore metodo per ottenere un siero di sangue negli animali sani con alto potere antitossico ed antibatterico e tale da potersi usare senza sospetti nell'uomo.

Più tardi *Figari*, per consiglio del nostro Maestro, propinava per le vie digerenti di animali sani l' *antitossina Maragliano* e vedeva, come già il *Mercatelli*

per la peste e lo *Sclavo* per la difterite, svilupparsi nei sieri di questi animali, in modo assai pronunciato, energie difensive specifiche.

Inoltre dimostrava, dopo una serie di indagini, come il *coagulo sanguino* contenesse, più del siero di sangue, le sostanze immunizzanti, e che somministrato per via gastrica costituisse un'ottima antitossina.

Si stabiliva così un nuovo principio, quello che i materiali difensivi contro le infezioni batteriche introdotti per le vie digerenti passano sicuramente nel sangue degli animali e ne inducono l'immunizzazione specifica.

Ma gli studi iniziatisi nell'Istituto Maragliano non si fermarono a questo punto.

Si volle ricercare anche il potere immunizzante del latte di animali refrattari alla tubercolosi e si potè constatare senza difficoltà che gli anticorpi e le antitossine bacillari contenuti nel sangue delle femmine immunizzate passano nel loro latte, per quanto in minore quantità. E questo ultimo studio fu certamente quello che spinse nel 1903, un anno cioè dopo le ricerche della Scuola Genovese, *Behring* a chiedersi *per la prima volta* se i materiali antitubercolari passavano nel latte e se potevano essere assorbiti dal tubo digerente! E come se non bastasse, anche qui in Italia pochi giorni or sono un italiano, allo scuro certamente di quanto succede fra noi, sentiva il bisogno di scrivere:

« Ha osservato il Behring, che se si inoculano le mucche con dei germi della tubercolosi umana adoperando quantità dapprima molto piccole, poscia gradual-

mente crescenti del germe stesso le mucche finiscono coll' essere realmente vaccinate contro la tubercolosi talchè esse più non si ammalano di questa malattia per quanti tentativi noi mettiamo in opera per infettarle artificialmente. E per giunta il latte di queste vacche contiene delle particolari sostanze le quali sono capaci di proteggere i vitellini poppanti contro la tubercolosi.

Di fronte a questo fatto Behring non si è peritato di annunciare alle madri tedesche che l'ora della nuova cura era ormai vicina. Somministrando quel meraviglioso alimento che è il latte e raccogliendolo da mucche immunizzate le madri avrebbero operato la più sicura e valida vaccinazione contro la tubercolosi.

Il pubblico tedesco non ha mancato di entusiasmarsi alla parola di chi gode fama di maestro insuperato nella biologia sperimentale ed a Marburgo si è cominciato su vasta scala il trattamento delle mucche lattifere. Il Governo stesso si è interessato direttamente alla questione ed il Parlamento ha votato le somme necessarie per verificare e controllare le ricerche di Behring avviando in caso positivo su un terreno pratico la soluzione del problema. »

Noi, naturalmente, lascieremo al vostro criterio ogni commento !

Poichè nella terapia generale della tubercolosi il metodo igienico-dietetico s' impone come quello che deve promuovere e creare un terreno adatto alle possibili resistenze acquisite con l' immunizzazione, e considerata la facilità con la quale l' organismo animale,

debitamente trattato, cede al suo sangue, al suo latte, ai suoi succhi vitali in genere, i materiali di difesa contro la tubercolosi e che alla loro volta, introdotti per via gastrica in altro animale, ne procurano l' immunizzazione specifica, se ne potrebbe conchiudere che l'alimentazione a base di carne di animale refrattario alla tubercolosi raggiungerebbe contemporaneamente due scopi: quello di mantenere in equilibrio il ricambio del tubercolotico e quello di renderlo a poco a poco capace di opporsi con maggiori resistenze all' azione patogena dei veleni tubercolari.

E da una serie di ricerche relative al ricambio dei tubercolosi di *Mircoli* e *Soleri* noi apprendiamo che « nell'organismo tubercoloso esistono condizioni le quali non impediscono in modo fatale, assoluto, all'organismo l'assimilazione degli alimenti, ma solo o rendono le cellule torpide e insufficienti a prendersi tali materiali ovvero prendendoli normalmente li fanno elaborare ed eliminare troppo rapidamente, e che la prima parte del processo nutritivo, la digestione ed il passaggio in circolo di sostanze alimentari accade normalmente come dimostra il rapporto normale fra azoto fecale e azoto introdotto (7,2 o|o) il quale è piuttosto inferiore che non superiore alla media normale, l'8 o|o.

Perciò questa alimentazione carnea specifica avrebbe, come già l' antitossina Maragliano, il potere di regolare nell' organismo tubercolare la *diminuita* od *esagerata attività cellulare.* Da ciò l' origine delle nostre ricerche. Lasciando alla Chimica fisiologica il compito di ricercare per quali fenomeni di anabolismo e cataboli-

smo il *tessuto muscolare* si costituisca, si nutra, acquisti o perda proprietà speciali, ci occuperemo ad osservare quale azione possa avere sul bacillo di Koch il *plasma* muscolare di animali sani e artificialmente immunizzati contro la tubercolosi.

Date le esigenze scolastiche ci limitammo per ora a fare le nostre ricerche sul tessuto muscolare del *coniglio* ed a determinare l' attività patogena del bacillo, trattato con il plasma muscolare di questo animale, sulle *cavie* che, oltre ad essere i più conosciuti e comuni animali da laboratorio, sono i più sensibili alla tubercolosi.

Si principiò ad immunizzare in duplice modo, cioè *attivamente* e *passivamente,* quattro conigli n° 1, 2, 3, 4.

Il peso dei conigli scelti era per tutti presso a poco uguale e stando comuni criteri questi erano in perfetta condizione di salute.

I conigli n° 1 e 2 furono immunizzati attivamente.

Il metodo di *immunizzazione attiva* adoperato, e che noi riputiamo il migliore, è quello basato sull' uso di una così detta *polpa bacillare* (che viene fornita dall'Istituto Maragliano) costituita dal succo di bacilli molto virulenti, ottenuti per espressione e filtrati alla candela di Chamberland, succo privo assolutamente di bacilli, e non alterato nè dal calore nè da agenti chimici.

Così noi iniettando nell' organismo animale questa polpa bacillare provochiamo una vera immunizzazione attiva stimolando con grande efficacia la produzione di anticorpi e di antitossine.

Ed infatti l' immunizzazione in questo modo è sempre rapida e sicura.

Prima e dopo le inoculazioni vennero naturalmente osservati il peso, la temperatura ed il potere agglutinante del siero di sangue di tutti e quattro i conigli, senza procedere però alla ricerca del suo potere antitossico, onde non depauperare con ulteriori salassi gli animali e perchè reputammo bastevole, per accertarsi della avvenuta immunizzazione, la prova dello agglutinamento. E la ricerca sul potere agglutinante fu eseguita con il metodo di *Courmont* e *Arloing*, mediante le *colture omogenee* di tubercolosi.

Così, esperite le dovute norme della asepsi, norme che furono osservate sempre e per tutti gli animali, vennero inoculati per via sottocutanea ai conigli n° 1 e 2 in una prima iniezione c. c. 2 di *polpa bacillare*, dose che andò a giorni alterni aumentando metodicamente sino a salire, nello spazio di giorni 23, ad un massimo di c. c. 20 per iniezione.

Furono così in totale iniettati cc. 132 di *polpa* per coniglio.

Osservati giornalmente, ed i diarii sono conservati nei protocolli di esperienze dell'Istituto, gli animali non presentarono mai cospicue elevazioni termiche nè la loro diminuzione di peso fu esagerata.

Notevole però fu il fatto che il valore agglutinante dei sieri di sangue che, prima della immunizzazione, era pari a 1 : 5 e 1 : 10, giunse alla fine del trattamento ad essere pari a 1 : 150 e 1 : 200.

I conigli n° 3 e 4 furono anch' essi immunizzati, ma *passivamente*. Già sappiamo che questa immunizzazione consiste in ciò: che l' organismo degli animali in esperimento riceve direttamente per via sottocutanea, o per iniezione endovenosa, o per via gastrica gli anticorpi e l' antitossine, ottenutisi in altri animali con opportuno trattamento.

Ed il *siero antitossico* adoperato per l' immunizzazione passiva fu pure fornito dall' Istituto (e precisamente dalla vacca III, con potere agglutinante pari a 1 : 400) ed è un siero che contiene 1000 unità antitossiche, cioè che ha il potere, nella quantità di 1 c. c., di salvare dalla dose mortale di tubercolina Maragliano (questa tubercolina serve come *texf-gift*, perchè ogni cc. di questa uccide costantemente 100 grammi di cavia sana) 1000 grammi di cavia.

Le iniezioni sottocutanee di *siero antitossico* vennero praticate a giorni alterni cominciando con una iniezione di c. c. 2 e salendo metodicamente ad un massimo di cc. 10 per iniezione e per lo spazio di giorni 22, così che in totale vennero iniettati cc. 63 di siero per coniglio.

Il potere agglutinante di questi due conigli si elevò, come per i precedenti, ad un valore pari a 1 : 150 per il coniglio n° 4 e a 1 : 200 per il coniglio n° 3.

Riassumiamo nella seguente tabella i dati più importanti:

Coniglio	Prima della immunizzazione			Quantità totale di polpa bacill. in c. c.	Quantità totale siero antitoss. in c. c.	Dopo la immunizzazione		
	Peso in gr.	Temp.	Potere aggl. siero di sangue			Peso in gr.	Temp.	Potere aggl. siero di sangue
1	1850	38°	1 : 5	132		1725	38°4	1: 150
2	1720	37°8	1 : 5	132		1660	38°2	1: 150
3	1940	37°9	1: 10		63	1790	38°1	1: 200
4	1810	38°1	1 : 5		63	1800	38°	1: 150

Tali essendo i risultati ottenuti, ritenemmo raggiunta la immunizzazione e procedemmo senz' altro a sacrificare gli animali onde raccogliere dal loro tessuto muscolare il *plasma*, obbietto delle nostre ricerche.

Vennero perciò utilizzati:

2 conigli sani.

2 conigli immunizzati attivamente (conigli n° 1 e 2).

2 conigli immunizzati passivamente (conigli n° 3 e 4).

Per la raccolta del tessuto muscolare e del suo plasma fu osservata naturalmente la più scrupolosa asepsi, per quanto ce la permisero i nostri mezzi, sterilizzando cioè i ferri necessari e praticando la massima nettezza. Per ottenere il plasma perfettamente privo di sangue irrigammo con abbondanza i muscoli degli animali, innestando loro una cannula nell'aorta ed un'altra nella cava inferiore e facendo scorrere nei vasi una soluzione fisiologica di Na Cl. finchè questa riescì del tutto limpida dalla cava. Poscia isolammo il tessuto muscolare nettandolo accuratamente da tutte le parti grasse e connettivali visibili e lo raccogliemmo in vaso

sterilizzato e tappato. Immediatamente dopo questa ultima operazione riducemmo a poltiglia, in un piccolo trituracarne sterilizzato, il muscolo ottenuto e lo sottoponemmo a forte e progressiva pressione mediante un torchietto a vite smaltato e sterilizzato e che per il suo buon funzionamento dovemmo però modificare secondo certi speciali intendimenti.

Si stillarono in tal modo circa 25 c. c. di *plasma* per ogni 500 grammi di tessuto muscolare che raccogliemmo accuratamente e filtrammo nel vuoto, al filtro Chamberland, con candela B *(controle)*.

Ne ottenemmo così un filtrato del tutto limpido, giallo rossastro, alquanto opalescente, di reazione neutra, che si dimostrò completamente negativo all'esame microscopico e che noi conservammo in fialette chiuse alla lampada.

Passammo in seguito alla parte principale del nostro studio cioè ad osservare le modificazioni morfologiche dei bacilli della turbercolosi.

1° posti a digerire nel succo muscolare di coniglio sano.

2° posti a digerire nel succo muscolare di coniglio immunizzato.

3° iniettati, dopo la dimora fatta in uno dei due succhi, rispettivamente, nella *cavia sana* per via sottocutanea ed endoperitoneale.

Ci siamo serviti all' uopo di una coltura in brodo di tubercolosi umana, virulenta, dell' età di circa cinque settimane.

Da questa abbiamo isolati mediante i soliti mezzi,

cioè della filtrazione alla carta, della lavatura con acqua sterilizzata, del prosciugamento con carta bibula pure sterilizzata, una certa quantità di bacilli che abbiamo distribuiti, nella quantità di gr. 0,10 *pro dose*, in provette sterilizzate contenenti ciascuna c. c. 20 di uno dei seguenti liquidi:

plasma muscolare di animale sano,

plasma muscolare di animale immunizzato,

soluzione di cloruro di sodio (0,75 0|0) e che chiameremo *coltura madre*.

Le provette così preparate vennero poste nel termostato alla temperatura di 38°.

Modificazioni morfologiche dei bacilli della tubercolosi nei vari liquidi.

Per lo spazio di sette giorni abbiamo osservato diuturnamente al microscopio con preparati colorati con il metodo di Ziehl le possibili modificazioni morfologiche alle quali potevano sottostare i bacilli della tubercolosi tenuti a digerire nei tre suaccennati liquidi.

Reperto delle osservazioni fatte sul liquido fornito dalla coltura madre (età 6 settimane).

Bacilli vivamente colorati con forme caratteristiche isolate od a ciuffo, qualche forma giovane clavata, talune allungate, altre vacuolizzate (degenerate).

Reperto delle osservazioni fatte sul liquido fornito dal tessuto muscolare di animale sano.

Bacilli ancora vivamente colorati, molti rigonfiati, con vacuoli, taluni presentano forme granulose di degenerazione, clavate, altri in forma di spirilli.

Reperto delle osservazioni fatte sul liquido fornito dal tessuto muscolare di animale immunizzato.

Forme degenerate digerite, che perdono in parte la colorazione caratteristica, forme granulose lunghissime, bacilli isolati o disposti a ciuffi od a catena, con ramificazioni laterali, con rigonfiamenti terminali a clava, alcuni composti di grossi granuli, altri ridotti a piccoli grani sferoidali vivamente colorati, isolati od a gruppi o a catena, con numerosi vacuoli.

Modificazioni morfologiche dei bacilli della tubercolosi dapprima lasciati a digerire per 7 giorni nei tre liquidi e quindi iniettati in cavia sana per via sottocutanea ed endoperitoneale.

Ci siamo serviti per queste serie di esperienze dei medesimi bacilli dei quali più sopra abbiamo riferito le modificazioni morfologiche e di cavie, come gli animali meno resistenti alla tubercolosi.

Per le iniezioni sottocutanee si adoperarono:

1° *una cavia controllo, cioè iniettata col solo liquido fornito dalla* coltura madre.

2° *una cavia iniettata col liquido fornito dal tessuto muscolare di* animale sano.

3° *una cavia iniettata col liquido fornito dal tessuto muscolare di* animale immunizzato.

4° *una cavia iniettata col liquido fornito dalla* coltura madre *da un lato del corpo e col liquido fornito dal tessuto muscolare di* animale sano *dall'altro lato.*

5° *una cavia iniettata col liquido fornito dalla* coltura madre *da un lato del corpo e con il liquido fornito dal tessuto muscolare di animale* immunizzato *dall'altro.*

Per le inoculazioni endoperitoneali bastarono tre cavie, ciascuna trattata con uno dei tre liquidi.

La quantità dei bacilli iniettati per ogni inoculazione fu sempre fissa e precisata. Avendo più sopra accennato come i tre liquidi contenessero per ogni 20 c. c. gr. 0,10 di bacilli virulenti, filtrati e asciutti, le iniezioni essendo state praticate nella quantità di 1|2 c. c. il peso dei bacilli fu necessariamente di gr. 0,005.

A) *Iniezione sottocutanea praticata nella regione inguinale delle cavie. Andamento dell'infezione. Modificazioni morfologiche dei bacilli osservati giornalmente al microscopio estratti dal pus.*

In 5ª giornata.

Cavia n. 1. Reazione generale non esagerata, locale cospicua con linfoangioite caratteristica, ingrossamento del ganglio.

I preparati microscopici (Colorazione col liquido di Ziehl. Decolorazione col liquido di Günter. Colorazione col bleu di metilene) danno: presenza di bacilli di Koch abbastanza bene conservati quali si poterono osservare nella *cultura madre,* cellule polinucleate e linfocitiche numerose, qualche rarissimo bacillo non ancora completamente inglobato.

Cavia n. 2. Id. id. come sopra. Più numerose le cellule linfocitiche, qualche rarissimo bacillo inglobato.

Cavia n. 3. Reazione locale minima, che cessò quasi completamente in 5ª giornata. Il ganglio dopo un leggiero ingrossamento che durò dai 3-4 giorni si ridusse nuovamente restando però sempre di consistenza fibrosa. Non si ebbe ulcerazione della bozza.

Il preparato microscopico denota la presenza di bacilli non però troppo numerosi, che assumono assai male la colorazione, con rigonfiamenti polari a clava, con ramificazioni e con vacuoli.

Cavia n. 4. Reazione generale cospicua. Reazione locale accentuata a tutti i due lati. Si osservò però come questa reazione sia stata alquanto minore, per quanto poco apprezzabile, dal lato iniettato con liquido fornito dal tessuto muscolare. La ragione di questo fatto sta certamente in ciò che maggiore fu la quantità di bacilli tubercolari con forme degenerative iniettati. Infatti in questo lato i bacilli mostrarono una maggiore tendenza alla distruzione ed all'inglobamento.

Al microscopio le osservazioni non differirono molto da quelle fatte sulle cavie n. 1 e n. 2.

Cavia n. 5. Reazione generale non eccessivamente cospicua. Viva reazione locale nel lato iniettato con liquido fornito dalla *coltura madre.* Dall' altro lato reazione locale torpida. Microscopicamente valgono i reperti sulle cavie n. 1 e n. 3.

In 15ª giornata.

Cavia n. 1. Condizioni generali non troppo buone. Dimagrimento notevole. Fluidificazione del ganglio in 7ª giornata. Al microscopio si ha: scarsa quantità di bacilli, poco colorati. Buona parte di questi sono resistenti alla decolorazione di Günter. Molti sono inglobati od attorniano i linfociti. Si ha qualche rara cellula di neoformazione.

Cavia n. 2. Vale il reperto precedente. La fluidificazione del ganglio avvenne però in 10ª giornata.

Maggiore la quantità dei bacilli tubercolari inglobati nelle cellule linfocitiche.

Cavia n. 3. Condizioni generali buone. Persiste l'induramento del ganglio. Pochissimi i bacilli tubercolari e quasi tutti in degenerazione.

Cavia n. 4. Valgono i reperti delle cavie n. 1 e 2.

Cavia n. 5. Condizioni generali non troppo buone.

Microscopicamente valgono i reperti delle cavie n. 1 e n. 3.

La cavia n. 1 morì in 28° giorno.

La cavia n. 2 morì in 30° giorno.

La cavia n. 3 è tuttora vivente.

La cavia n. 4 morì in 22° giorno.

La cavia n. 5 morì in 29° giorno.

B) *Iniezione endoperitoneale dei tre liquidi.*

Furono iniettate per *via endoperitoneale* tre *cavie sane* cioè:

cavia A con liquido fornito dalla coltura madre;

cavia B con liquido fornito dal tessuto muscolare di animale sano;

cavia C con liquido fornito dal tessuto muscolare di animale immunizzato.

Reperto cavia A — Rapida cachessia. Notevole dimagramento. Reazione generale caratteristica. Morte in 15ª giornata.

All'autopsia. Nella località dove venne praticata l'iniezione si riscontrò la formazione di noduli di infiltrazione leucocitica, alcuni con disfacimento caseoso.

Nel polmone focolai emorragici dei quali alcuni piccolissimi, presenza nell'endotelio di cellule emoglo-

binifere e globulifere, necrosi degli endoteli proliferati.

Nel fegato e nel rene degenerazione grassa del tessuto. Tubercolosi meseraica.

Reperto cavia B — Il reperto poco si discosta da quello della cavia *A*. Solamente la morte avvenne in 25ª giornata.

Reperto cavia C — Ebbe un dimagramento iniziale che si arrestò in 8ª giornata. È tuttora viva ed in buona salute.

Parte Quarta.

Per maggior controllo abbiamo anche provato il *potere antitossico* dei due liquidi forniti dai succhi di animali sani ed immunizzati.

Abbiamo perciò, con le solite cautele, iniettato nelle cavie D, F, G, H (scelte sane) per via sottocutanea una soluzione di *tubercolina acquosa* (tubercolina Maragliano con potere tossico perfettamente calcolato) al 1 o[o sia *pura* sia *associata* con i due succhi muscolari (all'1 ed al 2 o[oo).

Il risultato dell'esperienza fu tale quale è rappresentato dalla seguente tavola:

Cavia	Giorno del decesso dopo l'iniezione	Iniezione all' 1 0[0 di tubercolina	Iniezione all'1 0[0 di tubercolina e all'1 0[00 di plasma (animale sano)	Iniezione all'1 0[0 di tubercolina e all'1 0[00 di plasma (animale immunizz.)	Iniezione all'1 0[0 di tubercolina e al 2 0[00 di plasma (animale immunizz.)
D	4°	✠			
F	7°		✠		
G	10°			✠	
H	—				vivo

Con la tecnica semplicissima usata noi abbiamo adunque potuto seguire al microscopio la sorte dei bacilli lasciati a digerire nel plasma dei conigli sani e dei conigli immunizzati in confronto con i bacilli di una *coltura madre* e poscia la loro azione patogena, più o meno spiccata, nel tessuto sottocutaneo o peritoneale di cavie sane.

Ed abbiamo così potuto riconoscere che mentre i bacilli della coltura madre e quelli lasciati a digerire nel plasma muscolare di coniglio sano perdevano punto o poco la loro proprietà morbigena, determinando nelle cavie sia una reazione generale che locale rapida ed intensa, i bacilli che furono tenuti a digerire nel plasma muscolare di coniglio immunizzato perdevano ben presto i loro caratteri morfologici speciali e non erano più capaci di terminare nella cavia se non una transitoria e poco accentuata reazione.

Ed il potere tossico della *tubercolina acquosa* anche si dimostrò manifestamente diminuito quando la si iniettò mescolata con plasma muscolare di coniglio immunizzato.

Adunque questo plasma così trattato non è un liquido indifferente pel bacillo della tubercolosi e neppure possiede le stesse proprietà biologiche del plasma muscolare del coniglio sano — cioè non immunizzato.

E riportandoci ai precetti suesposti sulla immunizzazione artificiale e traendo le conclusioni dalle nostre personali esperienze dovremo riconoscere che un animale artificialmente immunizzato contro la tubercolosi ha la proprietà di distribuire gli elementi di difesa non

solo al suo sangue, al suo latte etc., ma anche al suo *plasma muscolare*.

Dal complesso delle nostre osservazioni noi ne potremo perciò dedurre che: il *plasma muscolare di animale artificialmente immunizzato mostrerebbe di possedere energie battericide ed antitossiche contro il bacillo della tubercolosi.*

BIBLIOGRAFIA

Arloing. F. — L' agglutination du bacille de Koch par une sérum spécificue s'accompagne-t-elle d'une action bactériolytique et bactéricide? — Soc. de Biol. 1899 29 Iuillet.

Arloing. F. — Influence du sérum antitubercolineux sur la virulence du bacille de Koch. — Soc. de Biol. 1901. 13 Iuillet.

Arloing et Courmont. — Ricerca e valore clinico dell' agglutinazione del bacillo di Koch. — Congresso di Berlino per la lotta contro la tubercolosi; 1899.

Arrigo (D'). — Sulla presenza e sulle fasi del bacillo di Koch nelle così dette ghiandole scrofolose. — Centr. f. Bakteriol. Bd 28. 1900.

Babes. — Effetti del bacillo tubercolare e sue sostanze antagoniste. — Zeit, f. Hyg. Bd 23.

Badano. — Azione dei veleni tubercolari sul tessuto polmonare. — V. Cronaca della Clinica medica di Genova. 1900.

Bail. — Ricerca sull' influenza esercitata dai bacteri sulle alessine del siero. — Ark. f. Hyg. Bd. 35.

Baumgarten. — Contributo alla dottrina dell' immunità naturale. — Berl. klin. Woch. 1899. n. 41.

Baumgarten. — Sulla dottrina dei mezzi di difesa naturale dell' organismo contro le infezioni. — Berl. klin. Woch. 1900. n. 7. 9.

Beck. — La siero-reazione alla Arloing-Courmont. — Deut. Aerzt. Ztg. 1901.

Behring. — Sui rapporti delle antitossine del sangue coi rispettivi veleni dell'infezione. — Deutsch. med. Woc. 1899. n. 1.

Behring. — La lotta contro la tubercolosi. Berl. Klin. Woch. 1903.

Bouchard. — Immunità e specificità. — Comptes rendus de l'Académie des Sciences CXXIX. pag. 388.

Buchner H. — Sulle alessine e le azioni specifiche battericide ed emolitiche. — Münch. med. Woch. 1900. n. 9.

Cantani e Maragliano. — Trattato Italiano di Patologia e Terapia medica.

Castronuovo. — Importanza della reazione locale nella genesi dell'immunità sperimentale. — Clin. Med. Ital. 1893. n. 2.

Charrin. — L'eredità e l'immunità proprietà cellulari. — Revue gén. des Sciences, 1894. n. 4.

Cobbet. — Origine dell' antitossina; è dessa presente nel sangue di alcuni animali normali?

Courmont. — Précis de bactériologie pratique. Paris, 1902.

Dembniski. — Ricerche sulla funzione dei leucotici nella tubercolosi sperimentale sottocutanea. — Thése de Paris, 1899.

Dungern. — Contributo alla dottrina dell' immunità. — Münch. med. Woch. 1900. n. 20.

Durham. — Discussione sulle proprietà agglutinanti o sedimentarie del siero, e loro rapporto coll' immunità. — Brit, med. Iournal. Sept. 1898.

Ehrlich. — Sulla tossina e l'antitossina. Wien. med. Presse. 1900. n. 33.

Etro U. — Agglutinamento e potere antitossico. — Tesi di laurea. Genova, 1903.

Fraenkel e Bronstein. — Ricerche sperimentali sulle tossine ed antitossine tubercolari. Berliner Klin. Woch. 1901.

Hahn e Tromsdorff. — Sull' agglutinina. — Münch. med. Woch. 1900 n. 13.

Landouzy et Griffon. — Transmission du pouvoir agglutinant. Soc. de Biol 1897, 6 novembre.

Mac Farland. — Tuberculin, antituberculin, and anti-tubercle serums.

Manfredi. — Significato del sistema dei gangli linfatici per la dottrina dell'infezione e dell'immunità. Virch. Ark. Bd. 155. Herst. 2.

Maragliano E. — La lotta e la immunizzazione dell'organismo contro la tubercolosi. Conferenza tenuta al XIV Congresso medico internazionale nell'aprile 1903, a Madrid.

Maragliano E. — Lezioni di chiusura al corso di Clinica Medica, lette negli anni 1896, 1897, 1898, 1899, 1900, 1901, 1902. — V. Cronaca della Clinica Medica di Genova.

Maragliano E. — Contributo sperimentale alla conoscenza dei fondamenti scientifici del trattamento igienico-dietetico della tubercolosi. — Congresso di Berlino per la lotta contro la tubercolosi 1899.

Maragliano E. — Fondamento scientifico della sieroterapia della tubercolosi. — Ibid.

Metchnikoff. — L'immunité. Paris, 1902.

Mircoli, Marzagalli, Sciallero. — Sulle alterazioni necrobiotiche del bacillo tubercolare. Cronaca della Clinica Medica di Genova: 1900.

Mossé. — Transmission du pouvoir agglutinant. — Soc. Méd. Hòp. 1896, 27 nov.

Neisser. — Sulla moltiplicità degli anticorpi trovantisi nel siero normale. — Deut. med. Woch 1900, n. 49.

Roncagliolo I. — Presenza di antitossine tubercolari nell' uomo. — Cronaca della Clinica Medica di Genova, 1900.

Schweimitz. — Prodotti dei bacilli tubercolari. — Centralblat f. Bakt. 1897.

Sullivan. — Tossine ed antitossine. — Dubl. Journal. 1900.

Teisser et Guinard. — Recherches expérimentales sur les effets des toxines microbiennes et sur quelques influences capables de les modifier. — Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol. 1897. 7 novembre.

Thiercelin et Lenoble. — Transmission du pouvoir agglutinant. — Presse médicale: 1897. 5 août.

Trumpf. — Il fenomeno dell'agglutinamento e suoi rapporti coll'immunità. — Arch. für Hyg. XXXIII, n. 2.

Vaillard. — Sur l'hérédité de l'immunité acquise. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1896. 1 février.

Mondovì, Tip. Vesc.